



Kandidaatintutkielma

Geenitekniikka ja CRISPR-Cas9-menetelmä

Elli Heikkinen

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

Sisällys

Käytetyt lyhenteet

1. Geenitekniikka	4
1.1 Geenitekniikan historiaa	4
1.2. Geenien muuntelun perusta	4
1.3. Geenimuuntelutekniikat ennen CRISPR-Cas9-menetelmää	5
1.3.1 Sinkkisorminukleaasit eli ZFN	5
1.3.2. TALEN eli transcription activator-like effector nuclease	6
1.4. CRISPR-Cas9-menetelmä	7
1.4.1. Alkuperä ja toiminta	7
1.4.2. Cas9-proteiini	8
1.4.3. Geenien muokkaus CRISPR-Cas9-menetelmällä	9
2. CRISPR-Cas9 -menetelmän käyttö sairauksien hoidossa	11
2.1. Syöpä	11
2.1. HIV	12
2.2. Perinnölliset sairaudet: sirppisoluanemia, Leberin synnyynnäinen amauroosi 10 ja kystinen fibroosi	14
3. Geenitekniikan riskit ja eettiset ongelmat ihmisen genomin muuntelussa	16
4. Lähteet	18

Käytetyt lyhenteet

AAV	adeno-associated virus
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
bp	base pair
CAR T	chimeric antigen receptor T-cell
Cas9	CRISPR associated protein 9
CF	cystic fibrosis
CRISPR	clustered regulary interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
CRS	cytokine release syndrome
DSB	double-strand break
gRNA	guide RNA
HIV	human immunodeficiency virus
HR	homologous recombination
iPSC	induced pluripotent stem cell
LCA10	Leber's congenital amaurosis 10
LTR	long terminal repeat
NHEJ	non-homologous end joining
PAM	protospacer adjacent motif
PD-1	programmed cell death protein 1
pre-crRNA	poly-spacer precursor CRISPR RNA
RNP	ribonucleoprotein
RVD	repeat variable di-residue
sgRNA	single guide RNA
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
tracrRNA	trans-activating crRNA
ZFN	zinc finger nuclease

1. Geenitekniikka

1.1 Geenitekniikan historiaa

Geenitekniikan käyttö on arkipäivää monella tieteenalalla ja myös tavallisten ihmisten jokapäiväisessä elämässä. Monet kaupassa myytävät elintarvikkeet ovat geneettisesti muokattuja ja aika ajoin mediassa uutisoidaan geenitekniikan läpimurroista. Mutta mitä ovat geenitekniikka ja siihen liittyvät menetelmät?

Geenitekniikalla (eng. genetic engineering) tarkoitetaan organismin perimän muuntelua ja siihen liittyviä menetelmiä. Geenien muunteluun kuuluu mm. nukleotidien lisääminen perimään (eng. knock-in), geenien poisto käytöstä (eng. knockout) sekä geenien muuntelu niin, että niissä tapahtuu mutaatio. Geenitekniikkaan kuuluu perimän muuntelun lisäksi myös geenien eristys, analysointi, kuten sekvensointi ja geneettinen testaus (eng. screening) sekä geenien siirtäminen toisiin organismeihin (Happonen et al., 2016; synthego.com, 2020a).

Geenien muuntelua on tehty jo vuosikymmeniä, ensimmäisen kerran 1970-luvulla, kun ensimmäinen antibioottiresistentti plasmidi saatiin kloonattua *in vitro* (Cohen et al., 1973). 1980-luvulla tehtiin ensimmäinen transgeeninen eläin DNA-mikroinjektiolla (Wagner et al., 1981). Ensimmäinen tehokas ja kohdennettu geenimuuntelutekniikka, sinkkisorminukleaasit (eng. zinc finger nuclease, ZFN), löydettiin 1980-luvun puolivälissä (Miller et al., 1985). Parikymmentä vuotta myöhemmin löydettiin TALEN (eng. transcription activator-like effector nuclease), jota alettiin käyttää suurenevissa määrin geenimuunteluun 2010-luvulla. Vuonna 2012 otettiin käyttöön CRISPR-Cas-menetelmä (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats ja CRISPR-associated protein) (Jinek et al., 2012), joka on tähän mennessä käytössä olleista menetelmistä yksinkertaisin ja kustannustehokkain.

1.2 Geenien muuntelun perusta

DNA-kaksoisjuosteen katkeaminen (eng. double-strand break, DSB) on yksi tavallisimmista DNA:n vahingoista, ja se ilmenee kaikissa eliöissä. DSB:n syynä voi olla mm. ionisoiva säteily tai tietyt kemikaalit, virheet DNA:n replikaatiossa, virheet DNA:n korjaamisessa tai oksidatiivinen stressi. DSB ja sen korjaukset voivat johtaa mutaatioihin ja kromosomien muutoksiin, joiden seurauksena voi olla solukuolema tai syöpä (Cannan and Pederson, 2016). Koska kaksoisjuosteen katkeaminen on yleistä, on sille myös korjauskeinoja. Riippuen solusyklin vaiheesta, solut korjaavat DSB:n yleensä joko homologisella rekombinaatiolla (eng. homologous recombination, HR) tai ei-homologisella päiden yhdistämisellä (eng. non-homologous end joining, NHEJ). Homologinen rekombinaatio tapahtuu yleensä vain solusyklin

S- ja G₂-vaiheissa, kun taas NHEJ esiintyy yleensä G₀- ja G₁-vaiheissa. HR käyttää mallinaan yleensä sisarkromatidia, joten DNA-polymeraasientsyymien korjauksen tulos on täsmällinen ja tarkka (Huertas and Jackson, 2009). NHEJ taas muokkaa DNA-juosteiden päät käyttämättä minkään laista mallia niin, että ne voidaan yhdistää. Tämä epätarkka muokkaus voi johtaa mutaatioihin mahdollisten insertioiden tai deleetioiden takia, ja nämä mutaatiot taas voivat johtaa esimerkiksi syöpään tai immuunitauteihin (Bibikova et al., 2002; Huertas and Jackson, 2009; Kansikas et al., 2017).

Kaikki aiemmin mainitut geenimuuntelun menetelmät perustuvat soluissa luontaisesti esiintyviin DNA:n tunnistus-, katkeamis- ja korjausmenetelmiin, ja käyttävät niitä hyväkseen. Mutta kuinka niiden avulla saadaan DNA katkaistua juuri halutusta kohdasta ja kuinka korjata se juuri halutulla tavalla?

1.3. Geenimuuntelutekniikat ennen CRISPR-Cas9-menetelmää

1.3.1 Sinkkisorminukleaasit eli ZFN

Sinkkisorminukleaasien (ZFN) toiminta perustuu DNA:han sitoutuvien sinkkisormiproteiinien ja epäspesifisen endonukleaasidomeenin yhdistelmään. Sinkkisormidomeeni koostuu kolmesta Cys₂His₂-sinkkisormesta, joista jokainen pystyy tunnistamaan yhden DNA-kodonin. Näin ollen yksi sinkkisormidomeeni pystyy tunnistamaan yhdeksän emäksen pituisen DNA-jakson. Yhdistämällä useampia sinkkisormia, tunnistetun yhtenäisen DNA-jakson pituus voi olla jopa 18 emäsparia (eng. base pair, bp). Endonukleaasidomeeni on *Flavobacterium okeanokoites*-bakteerista eristetty DNA:ta pilkkova domeeni nimeltään *Fok I*. Yhdistämällä nämä kaksi domeenia, on saatu aikaan ns. kimeerinen restriktioendonukleaasi, jonka ominaisuuksiin kuuluu sekä DNA-jakson spesifinen tunnistaminen että sen leikkaaminen (Bibikova et al., 2002; Kim et al., 1996; Nemudryi et al., 2014).

ZFN:n hyvä puoli on se, että se pystyy tunnistamaan pitempiä DNA-jaksoja verrattuna bakteerien restriktioentsyymeihin, joita käytettiin DNA:n leikkaamisessa ennen ZFN:n löytämistä. Useimmat luonnosta löytyvät restriktioentsyymit pystyvät tunnistamaan 4-6 bp:n pituisia jaksoja, joten restriktioentsyymit pilkkovat DNA:ta useammin verrattuna ZFN:aan, joka voi tunnistaa pitempiä yhtenäisiä DNA-jaksoja. Tälle löytyy luonnollinen selitys, sillä bakteerit taistelevat viruksia vastaan pilkkomalla niiden DNA:ta restriktioentsyymien avulla, ja lyhempi leikkausväli on tehokkaampi DNA:n pilkkomisessa (Kim et al., 1996). ZFN lisää homologisen rekombinaation todennäköisyyttä, jolloin DSB:n korjaus on täydellinen (Bibikova et al., 2001; Ramirez et al., 2012), eikä haitallisia mutaatioita esiinny. Edellytyksenä

homologiselle rekombinaatiolle on DNA-mallin läsnäolo, esimerkiksi sisarkromatidi tai muu malli, kuten soluun viety DNA-juoste.

ZFN:n huono puoli on se, että sinkkisormet tunnistavat kolmen emäksen kodoneita, minkä takia virheet DNA:n tunnistamisessa ovat mahdollisia (eng. off-target effect, esim. yksi emäs ei täsmää, mutta ZFN sitoutuu DNA:han silti). Haluttujen proteiinikompleksien tuottaminen on myös kallista ja hankalaa, ja virheitä voi esiintyä myös domeenien välisessä toiminnassa (Nemudryi et al., 2014). Tästä huolimatta sinkkisorminukleaaseja on käytetty monien organismien, kuten rottien, seeprakalojen ja maissin, sekä solujen, kuten ihmisen T-solujen, genomien muokkaamiseen (Rebar et al., 2010).

1.3.2. TALEN eli transcription activator-like effector nuclease

TALEs eli transcription activator-like effectors ovat *Xanthomonas*-bakteerien erittämiä proteiineja, jotka toimivat kasvisoluissa transkriptiotekijöinä aktivoiden sellaisia mekanismeja, jotka tekevät solusta alttiimman patogeeneille. TALE-proteiinit koostuvat DNA:han sitoutuvasta domeenista, tumaan vievästä signaalista (eng. nuclear localization signal) sekä kohdegeenin transkription aktivoivasta domeenista. DNA:han sitoutuva domeeni koostuu monomeereista, jotka ovat 34 aminohappoa pitkiä. Monomeerit ovat muuten identtisiä, mutta aminohapot 12 ja 13 ovat muuttuvia aminohappoja eli repeat variable di-residues, RVD. Nämä kaksi aminohappoa määrittävät sen, mihin DNA:n nukleotidiin monomeeri sitoutuu. Esimerkiksi RVD asparagiini ja isoleusiini (NI) tunnistaa nukleotidin adeniini (Li et al., 2011; Nemudryi et al., 2014).

Yhdistämällä TALE-proteiineihin myös sinkkisorminukleaaseissa käytetyn *Fok* I domeenin, saadaan aikaan endonukleaasi, joka tunnistaa ja leikkaa DNA:n halutusta kohdasta (Li et al., 2011) eli TALEN. TALEN toimii pareittain niin, että DNA:ta sitovien domeenien välillä on lyhyt välisekvenssi (eng. spacer sequence). DNA:ta sitovat domeenit tarttuvat DNA:han niin, että ne ovat vastakkaisilla puolilla kaksoisjuostetta, ja *Fok* I domeeni tekee DSB:n välisekvenssin kohdalle (Nemudryi et al., 2014).

Verrattuna sinkkisorminukleaaseihin, TALEN:ien etuna on monomeerit, jotka tunnistavat yhden nukleotidin. Näin DNA:n tunnistus on tarkempaa. TALEN:ien tuottaminen on myös helpompaa ja nopeampaa kuin ZFN:n proteiinikompleksien tuottaminen (synthego.com, 2020b). TALEN ei myöskään aiheuta soluissa samanlaisia sytotoksisia vaikutuksia, kuin ZFN (Li et al., 2011).

Vaikeutena myös TALEN:in käytössä on vääränlainen sitoutuminen DNA:han (off-target effects). Yksi RVD voi sitoutua useampaan aminohappoon, kuten asparagiini ja asparagiini (NN), joka voi sitoutua sekä guaniiniin että adeniiniin (Nemudryi et al., 2014), joten TALEN-kompleksin suunnittelussa on oltava tarkka. Myös TALE-proteiinin pituus vaikuttaa DNA:n tunnistamiseen, sillä pitempi TALE on vähemmän spesifinen ja voi aiheuttaa vääränlaista sitoutumista. Tämä voi johtua siitä, että mitä useampi monomeeri proteiinissa on, sitä suurempi on sen potentiaali sitoutua DNA:han, myös epäspesifisesti (Rogers et al., 2015).

Kuten ZFN, myös TALEN lisää HR:n todennäköisyyttä DSB:n korjauksessa. TALEN:ia on käytetty monien solulinjojen ja kasvisolujen geneettiseen muokkaamiseen *in vivo* ja *in vitro* (mm. knockout) (Nemudryi et al., 2014), ja vuonna 2011 Nature Methods valitsi sen vuoden metodiksi (Nature Methods, 2011).

1.4. CRISPR-Cas9-menetelmä

1.4.1. Alkuperä ja toiminta

Vuonna 1987 *Escherichia colin* geeneistä löydettiin toistojaksoja, joiden tehtävää ei osattu selittää (Ishino et al., 1987). 2000-luvun alussa nämä toistojaksot nimettiin CRISPR:ksi, eli clustered regularly interspaced short palindromic repeats. CRISPR esiintyy vain prokaryooteissa, eli arkeissa ja bakteereissa, ja CRISPR-lokuksia sijaitsee useissa kromosomeissa, minkä perusteella niiden pääteltiin olevan genomien liikkuvia elementtejä. CRISPR koostuu toistojaksoista, joiden välillä on välisekvenssejä (eng. spacer sequence; spacers). Saman lokuksen toistojaksot ovat toisiinsa nähden samanlaisia tai niissä on vain pieniä eroja, kun taas välisekvenssit ovat erilaisia. Lisäksi prokaryooteissa, joista löytyy CRISPR-lokus, löytyy myös Cas-proteiineja (eng. CRISPR associated proteins) (Jansen et al., 2002). Myöhemmin kävi ilmi, että CRISPR:n ja Cas-proteiinien tehtävänä on toimia puolustusmekanismina viruksia (bakteriofageja) vastaan (Barrangou et al., 2007).

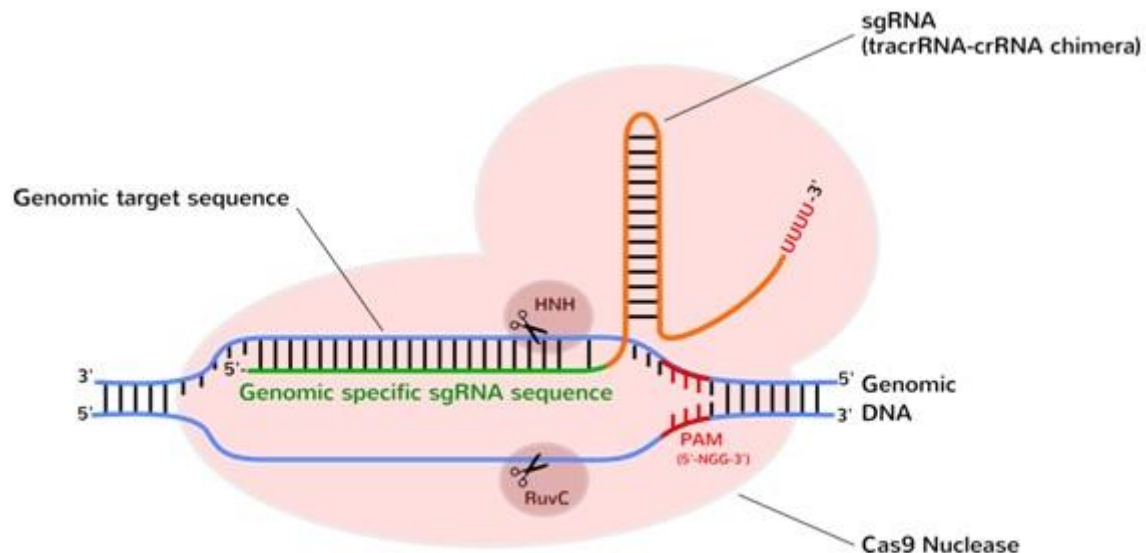
CRISPR-Cas:n toiminta perustuu välisekvensseihin (spacers), jotka tunnistavat osan soluun hyökänneen patogeenin genomista. Välisekvenssit ovat alun perin saatu viruksista, jotka ovat hyökänneet prokaryoottisoluun aiemmin, mutta solu ei ole kuollut. Välisekvenssit ovat komplementaarisia alkuperäisen viruksen genomien osan, ns. protospacerin kanssa, ja ne on liitetty CRISPR-lokukseen. Seuraavan kerran kun virus hyökkää soluun, koko CRISPR-lokus luetaan ja transkriptio kautta saadaan aikaan pre-crRNA eli poly-spacer precursor CRISPR RNA. Ei-koodaava RNA, trans-activating crRNA eli tracrRNA, sitoutuu pre-crRNA:n toistojaksoihin. Tämä RNA leikataan Cas-proteiinien avulla lyhyemmiksi pätkiksi, ja saadaan

aikaan valmiita (eng.mature) crRNA-molekyylejä. Tätä crRNA:n ja tracrRNA:n yhdistelmää kutsutaan myös single guide RNA:ksi (sgRNA) tai guide RNA:ksi (gRNA). Jos hyökännyt virus on sama kuin minkä solu on jo kohdannut aiemmin, crRNA tunnistaa viruksen genomien sitoutuen protospaceriin ja johdattaen samalla endonukleaasina toimivan Cas-proteiinin leikkaamaan viruksen DNA:n, jolloin siitä tulee toimintakyvytön. Apuna tunnistamisessa on myös lyhyt, 2-5 emäksen pituinen sekvenssi, protospacer adjacent motif eli PAM, joka sijaitsee kohde-DNA:ssa ennen protospaceria alle kymmenen emäksen päässä. (Jinek et al., 2012; Nemudryi et al., 2014). CRISPR-Cas-systeemi on siis osa bakteerien ja arkkien hankittua immuniteettia.

1.4.2. Cas9-proteiini

Cas-proteiineja on useita, ja CRISPR-Cas-menetelmä voidaan jakaa kahteen eri ryhmään ja niiden sisällä useampaan eri tyyppiin sen mukaan, millaisia geenejä ja Cas-proteiineja on käytössä. Käytetyin CRISPR-Cas menetelmä on CRISPR-Cas9-menetelmä, joka kuuluu ryhmään II ja tyyppiin II. Cas9-proteiini on saatu alun perin *Streptococcus pyogenes* -bakteerista, ja se on suosituin, sillä Cas9-proteiini on yksinkertaisin verrattuna muihin Cas-proteiineihin (Makarova et al., 2015; Makarova and Koonin, 2015).

Cas9-proteiini on kahden endonukleasientsyymin yhdistelmä. Molemmat näistä entsyymeistä muistuttavat bakteereissa esiintyviä endonukleaaseja HNH ja RuvC. Cas9-proteiinin HNH-domeenin tehtävänä on leikata kohde-DNA komplementaariselta puolelta, eli siltä puolelta, johon gRNA sitoutuu. Leikkauskohta on 3 emäsparin päässä PAM:sta. RuvC-domeeni taas leikkaa DNA:n ei-komplementaariselta puolelta, 3-8 emäsparin päästä PAM:sta (kuva 1) (Jinek et al., 2012).



Kuva 1. CRISPR-Cas9-systeemin toiminta. sgRNA on sitoutunut kohde-DNA:han PAM-sekvenssin lähellä, ja HNH- ja RuvC -domeenit leikkaavat DNA-kaksoisjuosteen vastakkaisilta puolilta. Kaksoisjuosteen katkeamiskohta korjataan joko HR:lla tai NHEJ:lla. Kuva muokattu lähteestä [ozbiosciences.com](https://www.ozbiosciences.com) (<https://www.ozbiosciences.com/content/58-transfection-reagents-for-genome-editing>). Lupa kuvan käyttöön saatu yritykseltä OZ Biosciences.

1.4.3. Geenien muokkaus CRISPR-Cas9-menetelmällä

Kohdennettujen nukleaasien (eng. site-specific nucleases) avulla genomia voi muokata neljällä eri tavalla: häiritsemällä geenin toimintaa, jolloin toimivaa proteiinituotetta ei voida tuottaa (knockout), poistamalla osa genomista (deleetio), korjaamalla geenissä olevat virheet tai lisäämällä genomiin kokonainen geeni (additio eli knock-in). Helpoin tapa luoda knockout-geeni on katkaista DNA halutusta kohdasta ja antaa NHEJ:n korjata katkos. Deleetiossa taas tehdään kaksi leikkauskohtaa, joiden väliin poistettava DNA-kohta sijoittuu. Sekvenssin päät liitetään yhteen NHEJ:lla. Kun geenissä oleva virhe, kuten mutaatio, halutaan poistaa ja korjata, tai genomiin halutaan lisätä pitempi sekvenssi (geeni), täytyy korjauksen tapahtua homologisella rekombinaatiolla, mikä taas tarkoittaa sitä, että korjaukselle on annettava malli-DNA eli DNA-templaatti (Lino et al., 2018).

Jotta minkäänlaisia genomien muokkauksia voidaan tuottaa halutulla tavalla, on CRISPR-Cas9-kompleksi suunniteltava huolellisesti. Koska vääränlainen sitoutuminen on mahdollista, on kohde-DNA:n oltava mahdollisimman spesifinen, jotta gRNA sitoutuu siihen oikein. Kohde-DNA:n läheisyydessä on myös oltava PAM, koska ilman sitä sitoutuminen ja leikkaaminen ei ole mahdollista. Eri prokaryooteista peräisin olevat Cas-proteiinit tunnistavat eri PAM-sekvenssejä, joten tärkeää on myös valita oikea Cas-proteiini. Suosituin, eli Cas9-proteiini

tunnistaa PAM:n 5'-NGG-3', jossa N on mikä tahansa emäs ja G on guaniini (Nemudryi et al., 2014). gRNA ei saa olla liian pitkä eikä liian lyhyt, ja toimivin gRNA on noin 20 nukleotidin pituinen. Pidempi gRNA leikkautuu solussa lyhemmäksi (Ran et al., 2013) ja todennäköisesti lisäksi ei-haluttua sitoutumista. Liian lyhyt gRNA (alle 15 nukleotidia) taas muuttaa CRISPR-Cas9-kompleksin toimimattomaksi (Lv et al., 2019).

Kun kompleksi on suunniteltu, on se siirrettävä solun sisälle. Tätä varten CRISPR-Cas9-systeemi on oltava jossakin seuraavista muodoista: plasmidina, joka koodaa sekä gRNA:n että Cas9-proteiinin, ribonukleoproteiini-kompleksina (RNP), jossa Cas9-proteiini ja gRNA ovat yhdessä tai mRNA/gRNA-sekoituksena, jossa mRNA koodaa Cas9-proteiinia. Systeemi tarvitsee vielä kuljetustavan, jolla se saadaan soluun. Kuljetustapa määrää sen missä muodossa systeemi on, ja kuljetustavan määräävät olosuhteet. Kuljetustavat voidaan jakaa fysikaalisiin, virusperäisiin vektoreihin ja ei-virusperäisiin vektoreihin. Fysikaalisia kuljetustapoja ovat mm. mikroinjektio, jossa systeemi ruiskutetaan suoraan solun sisälle, elektroporaatio (eng. electroporation), jossa käytetään sähkövirtaa solukalvon läpäisevyyden lisäämiseksi ja hydrodynaaminen kuljetus (eng. hydrodynamic delivery), jossa CRISPR-Cas9-systeemi on liuotettuna nesteeseen, joka ruiskutetaan verenkiertoon. Virusperäisiin vektoreihin kuuluu mm. AAV eli adeno-associated virus, ja ei-virusperäisiin vektoreihin kuuluvat esim. lipidi- ja peptidivektorit (Lino et al., 2018).

Kuljetustapa on valittava huolella, sillä niihin liittyy rajoitteita. Mikroinjektio on erittäin käytetty kuljetustapa, mutta sitä voidaan käyttää vain *in vitro*. Virusperäisiä vektoreita voi käyttää sekä *in vivo* että *in vitro*, mutta ne pystyvät kuljettamaan vain rajatun mittaisia DNA-sekvenssejä ja voivat aiheuttaa soluissa immuunipuolustusreaktion. Lipidikuljetus toimii sekä *in vivo* että *in vitro*, mutta lipidivektoreilla soluun viedyt materiaalit joutuvat usein lysosomeihin tuhottaviksi (Lino et al., 2018).

Verrattuna ZFN:aan ja TALEN:iin, CRISPR-Cas-menetelmä on geenien muokkauksessa halvin. Menetelmä perustuu melko yksinkertaiseen tekniikkaan, eikä suuria, monia domeeneja sisältäviä molekyyliä tarvitse suunnitella ja tuottaa. CRISPR-Cas on myös alun perin sellaisenaan prokaryooteissa esiintynyt mekanismi, kun taas ZFN ja TALEN ovat laboratorio-oloissa tuotettuja endonukleasidomeenin ja DNA:ta tunnistavien proteiinien yhdistelmiä. CRISPR-Cas:n käyttö on viime vuosina kasvanut samalla kun muiden menetelmien käyttö on kääntynyt laskuun, minkä voi nähdä esimerkiksi kyseisiin menetelmiin liittyvien julkaistujen artikkelien määrästä. CRISPR-Cas ei kuitenkaan ole aivan täydellinen, sillä siihenkin liittyvät

ongelmat vääränlaisen sitoutumisen (off-target effects) kanssa: koska DNA-jakson tunnistuksessa on käytössä vain yksi RNA-juoste, on sen sitoutuminen epäspesifisempää kuin esimerkiksi TALEN:in parittainen toiminta, jossa domeenien täytyy sitoutua molemmille puolille DNA-juostetta. CRISPR-Cas-kompleksin toimintaan tarvitaan myös PAM, sillä ilman sitä kohde-DNA:ta ei voi tunnistaa. CRISPR-Cas:n luoma DSB korjataan samalla tavalla kuin muissakin menetelmissä riippuen siitä, onko tarjolla DNA-mallia, eli NHEJ:lla, jos mallia ei ole, ja HR:lla jos malli on tarjolla.

CRISPR-Cas-menetelmä on potentiaalinen työkalu missä tahansa geenitekniikan sovelluksessa, esimerkiksi perinnöllisten sairauksien hoidossa ja geenien toiminnan tutkimisessa. Se on erilainen verrattuna aikaisempiin geenimuuntelumenetelmiin, koska se käyttää DNA:n tunnistuksessa apunaan RNA:ta eikä itse leikkaajaentsyymissä sijaitsevaa tunnistusdomeenia. Tarjolla on useampia Cas-proteiineja, jolloin muokkaus voidaan kohdentaa eri PAM-sekvenssien lähellä oleviin DNA-jaksoihin. CRISPR-Cas-menetelmän yksinkertaisuudesta ja halvemmasta hinnasta kertoo lisäksi se, että nykyään on jo mahdollista ostaa tee se itse -geenimuuntelupaketteja, joiden avulla voi kokeilla CRISPR-Cas-menetelmää kotiloissa. Onko CRISPR-Cas siis avain kohdennettuun ja turvalliseen geenimuunteluun, johon tutkijat ovat yrittäneet löytää sopivaa menetelmää jo puoli vuosisataa? Pystytäänkö tulevaisuudessa tätä menetelmää käyttämään ihmisten ja muiden eliöiden geenien muunteluun niin, että esimerkiksi perinnöllisiä sairauksia ei enää olisi?

2. CRISPR-Cas9 -menetelmän käyttö sairauksien hoidossa

2.1. Syöpä

Syöpä on yksi maailman yleisimmistä kuolinsyistä ja parannuskeinoa on etsitty monien eri tekniikoiden avulla. Vaikka CRISPR-Cas9-menetelmä on ollut käytössä vasta hyvin lyhyen ajan, on sitä ehditty käyttää jo monien eri syöpätyyppien tutkimiseen, ja meneillään on useita kliinisiä kokeita liittyen CRISPR-Cas9-menetelmän käyttöön syövän hoidossa. Useat näistä kokeista keskittyvät T-solujen muokkaamiseen, jolloin ne hyökkäävät syöpäsoluja vastaan tehokkaammin. Yksi tapa on luoda ns. CAR T-soluja (eng. chimeric antigen receptor T-cell) eristämällä potilaan omia T-soluja ja muokkaamalla niiden pintareseptoreita niin, että ne pystyvät spesifisesti ja tehokkaasti tunnistamaan syöpäsoluja, aktivoitumaan ja hyökkäämään syöpäsoluja vastaan. Muokkauksen jälkeen solut palautetaan potilaan elimistöön. T-solujen muokkaus CRISPR-Cas9-tekniikalla on tehokkaampaa muihin geenimuuntelutekniikoihin verraten ja CAR T-soluja voidaan tuottaa eri syöpätyyppejä vastaan. CAR T-soluhoido voi

kuitenkin aiheuttaa myös vakavia sivuvaikutuksia, kuten sytokiinin vapautusoireyhtymän (eng. cytokine release syndrome, CRS), joka johtuu jakaantuvista CAR T-soluista ja niiden runsaasti vapauttamista sytokiineista (Liu et al., 2019).

T-solut tuottavat pinnalleen PD-1-reseptoreja (eng. programmed cell death protein 1), joilla on tärkeä rooli immuunisolujen tasapainon säätelyssä. Kun PD-1-reseptorin ligandi (PD-L1) sitoutuu siihen, T-solujen aktiivisuus vähenee. Monet syöpäsolut tuottavat pinnalleen PD-L1-ligandeja, jolloin ne voivat inhiboida T-solujen toimintaa ja näin paeta elimistön immuunipuolustukselta. PD-1-reseptorin toiminta voidaan estää muokkaamalla T-soluja niin, että ne eivät tuota PD-1-reseptoreja. Näiden PD-1 knockout T-solujen on todettu hyökkäävän syöpäsoluja vastaan tehokkaammin kuin normaalit T-solut, sekä erittävän enemmän syöpäsoluja tuhoavia sytokiineja (Zhao et al., 2018).

CRISPR-Cas9-tekniikalla muokattuja PD-1 knockout T-soluja on jo kokeiltu kliinisessä kokeessa, jossa kolmeen potilaaseen (kahdella luuydinsyöpä, yhdellä tukikudossyöpä) siirrettiin tiputuksella T-soluja, joista PD-1-geeni oli poistettu käytöstä. Lisäksi soluihin oli lisätty geenejä, joiden vaikutuksesta T-solut tuottivat pinnalleen syöpäsoluja paremmin tunnistavia reseptoreita. CAR T-soluja ei käytetty CRS:n mahdollisuuden vähentämiseksi. CRISPR-Cas9-tekniikalla muokattujen T-solujen todettiin olevan turvallisia elimistössä (autoimmuunireaktiota ei tapahtunut). Lisäksi solujen todettiin kerääntyneen syöpäkasvaimien lähelle, ja syöpäsolujen vastaisen sytotoksisuuden lisääntyminen oli havaittavissa jokaisen kolmen potilaan elimistössä. Yhden potilaan kasvain oli jopa pienentynyt kokeen aikana. Vaikeutena kokeessa oli kuitenkin CRISPR-Cas9-kompleksin vääränlainen sitoutuminen, sillä noin 30 %:ssa potilaille annetuista T-soluista ei ollut yhtäkään mutaatiota, 40 %:ssa oli yksi mutaatio, ja lopuissa 30 %:ssa oli joko kaksi tai kolme mutaatiota (Stadtmauer et al., 2020).

2.1. HIV

HIV eli human immunodeficiency virus infektoi immuunijärjestelmän CD4-T-lymfosyyttejä eli T-auttajasoluja, mikä johtaa niiden tuhoutumiseen. Koska nämä solut ovat tärkeä osa ihmisen immuunipuolustusta, on HIV-infektio erittäin vaarallinen ja voi pahimmillaan johtaa Aidsiin (eng. acquired immune deficiency syndrome) eli immuunikatoon. HI-viruksia on kahta tyyppiä, HIV-1 ja HIV-2, joista HIV-1 on tarttuvampi ja näin ollen myös yleisempi. Nykyisten hoitomuotojen avulla viruksen replikaatio voidaan pitää hallinnassa ja infektion saanut voi elää lähes normaalia elämää, mutta koska HI-virus voi varastoitua T-solujen genomiin ns.

provirusena ja pysyä inaktiivisena pitkiäkin aikoja, ei täydellistä hoitokeinoa ole vielä löydetty (Xiao et al., 2019).

CRISPR-Cas9 -menetelmää on testattu HIV-infektion hoidossa jo vuodesta 2013. Koska HI-virus, kuten muutkin virukset, syöttävät oman perintöaineksensa kohdesolun DNA:han, voidaan CRISPR-Cas9:n avulla tehdä kohdennettuja muokkauksia juuri niihin kohtiin infektoituneen solun genomia, jotka kuuluvat alun perin HI-virukselle. Tätä on testattu esimerkiksi Jurkat-solulinjan soluilla, jotka ovat ihmisen CD4-T-lymfosyyttejä. Jurkat-solut infektoitiin HIV-1-viruksella, ja CRISPR-Cas9-systeemi kohdistettiin HIV-1:n toistojaksoihin, LTR-sekvensseihin (eng. long terminal repeat), joiden avulla HIV siirtää geneettisen materiaalinsa T-solujen genomiin. LTR-sekvenssejä on kaksi, ja ne sijaitsevat HIV-1-viruksen isäntäsoluun siirtämän DNA:n molemmissa päissä. Näin ollen CRISPR-Cas9 -systeemi voi mahdollisesti leikata koko vieraan genomien T-solun perimästä, jos leikkaus tapahtuu molemmissa päissä. Tutkimuksen tuloksena huomattiin, että kohde-DNA:ssa oli erilaisia deleetioita ja insertioita, jotka estivät sekä aktiivisen että piilevän viruksen replikaation. Lisäksi osassa infektoiduista soluista koko HIV-provirus oli leikkautunut pois genomista (Ebina et al., 2013). Vaikka tutkimuksen tulokset sinänsä ovat loistavia, CRISPR-Cas9-systeemin toimintaan liittyy vielä ongelmia: muokatuissa soluissa huomattiin myös odottamattomia mutaatioita, ja CRISPR-Cas9 -systeemi täytyi transfektoida soluihin useamman kerran tulosten saamiseksi. Mahdollista on myös viruksen genomien mutaatiot, jolloin CRISPR-Cas9-systeemi ei pystykään sitoutumaan oikeaan kohtaan DNA:ssa.

CD4-T-solujen pinnalla on reseptoreja, joita HIV-1-virus tarvitsee päästäkseen solun sisään: CD4-reseptori, jolla on myös tärkeä merkitys immuunipuolustuksessa, sekä koreseptorit CCR5 ja CXCR4. HIV-1 tarvitsee aina CD4-reseptorin päästäkseen soluun, mutta koreseptoreista se käyttää vain jompaakumpaa riippuen infektion vaiheesta. Muokkaamalla koreseptoreita koodaavia geenejä HIV-1-viruksen pääsy solun sisään voidaan estää. Koreseptorien muokkausta on tehty myös ZFN:n avulla ennen CRISPR-Cas9:ää, ja jo silloin tulokset olivat lupaavia. CRISPR-Cas9-menetelmää käyttäen useiden eri solujen ja solulinjojen CCR5- ja CXCR4-koreseptoreita on tutkittu ja muokattu (Xiao et al., 2019). Tutkimusten tuloksena on saatu aikaan HIV-1-resistenttejä soluja, kuten tutkimuksessa, jossa indusoituja pluripotentteja kantasoluja (eng. induced pluripotent stem cell, iPSC) muokattiin sekä CRISPR-Cas9-menetelmällä että TALEN:illa. Solujen CCR5-geeniin tehtiin 32:n emäsparin deleetio, joka on myös joissakin ihmisissä luonnollisesti esiintyvä mutaatio (CCR5 Δ 32). Muokatut iPSC:t erilaistettiin valkosoluiksi ja niiden HIV-1-resistenssi testattiin. 16 päivää viruksen

infektoimisesta soluihin muokkaamattomissa valkosoluissa näkyi HI-viruksen replikoitumista, mutta CCR5 Δ 32-mutatoiduissa valkosoluissa sitä ei näkynyt. Tutkimuksessa myös todettiin CRISPR-Cas9-tekniikan olleen TALEN:ia tehokkaampi muokkausmenetelmä, sillä CRISPR-Cas9-menetelmällä muokatuissa soluissa haluttu mutaatio esiintyi useammin ja homologista rekombinaatiota esiintyi neljä kertaa enemmän kuin TALEN:illa muokatuissa soluissa (Ye et al., 2014).

2.2. Perinnölliset sairaudet: sirppisoluanemia, Leberin synnynnäinen amauroosi 10 ja

kystinen fibroosi

Sirppisoluanemia (eng. sickle cell disease) on perinnöllinen tauti, joka periytyy resessiivisesti autosomaalisesti. Tauti johtuu pistemutaatiosta β -globiinissa, joka on osa hemoglobiinigeeniä. Näitä mutaatioita on useampia, mutta ne kaikki johtavat epämuodostuneeseen hemoglobiiniin (hemoglobiini S), mikä taas johtaa punasolujen muodon muuttumiseen sirppimäiseksi. Nämä punasolut eivät pysty kuljettamaan happea riittävän tehokkaasti, mikä johtaa potilailla mm. kipuihin eri puolilla kehoa ja punasolujen sirppimäinen muoto lisää verisuonitukosriskiä. Tautia on hoidettu hematopoieettisella kantasolusiirrolla, jossa ongelmana ovat sopivan luovuttajan löytäminen ja hylkimisreaktiot (Corless, 2019; Sundt et al., 2019).

CRISPR-Cas9-tekniikan avulla on muokattu potilaan omia hematopoieettisia kantasoluja niin, että ne saadaan tuottamaan hemoglobiini F:ää (eng. fetal hemoglobin). Hemoglobiini F on hemoglobiinin muoto, jota tuotetaan heti syntymän jälkeen, ja joka korvataan myöhemmin aikuisen hemoglobiinilla. Muokatut solut siirretään takaisin potilaan elimistöön. Hoitomuotoa testattiin ensimmäisen kerran vuonna 2019 kahdelle potilaalle, ja tulokset ovat lupaavia: neljän kuukauden jälkeen hoidosta ensimmäisen potilaan elimistön hemoglobiinista noin puolet oli hemoglobiini F:ää ja voimakkaat kipukohtaukset olivat loppuneet. Yhdeksän kuukauden jälkeen hoidosta toinen potilaista ei ollut saanut yhtäkään verensiirtoa, vaikka aiemmin hän tarvitsi niitä säännöllisesti (Corless, 2019; Stein, 2019).

Leberin synnynnäinen amauroosi 10 (eng. Leber's congenital amaurosis 10) eli LCA10 on resessiivisesti autosomaalisesti periytyvä sairaus, jonka aiheuttaa mutaatio geenissä CEP290. Geenin koodaamalla proteiinilla on vaikutus verkkokalvon fotoreseptorisolujen toimintaan, ja mutaation vaikutuksesta potilaan näkö on huonontunut tai se on menetetty kokonaan. LCA10:n aiheuttavia mutaatioita on useampia, ja yleisin mutaatio on pistemutaatio IVS26, jossa adeniini on muuttunut guaniiniksi CEP290-geenin intronissa 26. Tämä aiheuttaa vääränlaisen

silmukoinnin, mikä taas johtaa mRNA:n ennen aikaiseen lopetuskodoniin, minkä seurauksena tuotettu proteiini ei ole täysin toimintakykyinen (Maeder et al., 2019).

Koska LCA10:een ei ole toimivaa hoitokeinoa, apua on etsitty geenimuokkauksesta. CEP290-geenin sekvenssi on pitkä, joten ei sitä pystytä kuljettamaan soluihin tavallisella virusvektorilla. Tätä varten on suunniteltu kuljetustapa nimeltään EDIT-101, joka perustuu useiden eri plasmidien avustuksella tuotettuun AAV5-virusvektoriin, joka sisältää sekä CEP290-geenin gRNA:n ja Cas9-proteiinin. Tarkoituksena on tuottaa joko deleetio tai inversio IVS26-mutaatioon, jolloin mRNA:n oikeanlainen silmukointi voisi onnistua. EDIT-101 -menetelmää kokeiltiin vuonna 2019 ihmisen verkkokalvon soluihin *in vitro*, sekä hiiriin ja kädellisiin ruiskuttamalla vektori suoraan silmän verkkokalvolle fotoreseptorisolujen lähelle. CEP290-geenimuuntelu todettiin tehokkaaksi ja eläimissä havaittiin vain vähäisiä tulehduksen merkkejä, mitkä todennäköisesti johtuivat AAV5-vektorista (Maeder et al., 2019). Vuonna 2020 EDIT-101-menetelmää käytettiin ensimmäistä kertaa suoraan ihmiseen kliinisessä kokeessa, jossa EDIT-101:n sisältävä lääke ruiskutetaan suoraan ihmisen silmän verkkokalvolle, ja tarkoituksena on poistaa CEP290-geenissä oleva mutaatio. Tämä on myös ensimmäinen kerta, kun CRISPR-Cas9-menetelmään perustuvaa hoitoa on käytetty suoraan ihmiseen; aiemmin potilaan omia soluja on eristetty ja muokattu *ex vivo*, minkä jälkeen ne on palautettu potilaan elimistöön. Koska kliininen koe on aloitettu vasta, ei tuloksia olla vielä saatu (Ledford, 2020).

Kystinen fibroosi (eng. cystic fibrosis, CF) on autosomaalisesti resessiivisesti periytyvä sairaus, joka johtuu mutaatioista CFTR-geenissä. Geenin koodaama CFTR-proteiini on membraaniproteiini, joka kuljettaa kloridi-ioneja solukalvon läpi. Mutaatiot voivat aiheuttaa CFTR-proteiinin vajaatoiminnan, mikä aiheuttaa suolatasapainon muutoksia useissa soluissa ja elimissä (Maule et al., 2020). CF-potilaat kärsivät usein mm. haiman vajaatoiminnasta, imeytymishäiriöistä ja sitkeän liman kertymisestä hengitysteihin, mikä johtaa keuhkojen krooniseen bakteeritulehdukseen.

Kystinen fibroosi on useiden elinten sairaus, minkä vuoksi parannuskeinoa on vaikea löytää. Sairautta on tutkittu CRISPR-Cas9 -menetelmän avulla tekemällä tautimalleja, joissa eläinten, kuten lampaiden ja rottien, CFTR-geeniä on muokattu ja näin saatu aikaan CF:n kaltaiset oireet (Maule et al., 2020). Eräs uusimmista tutkimuksista myös näyttää, että CFTR-geeni on mahdollista korjata geenitekniikan avulla. Tutkimuksessa käytettiin muokattua Cas9-proteiinia, joka DSB:n sijasta tekee emäskorjauksen, tässä tapauksessa muuttaa emäsparin adeniini-tyymiini pariksi guaniini-sytosiini. Cas9-proteiinista oli myös kaksi eri versiota, jotka tunnistivat

kaksi eri PAM:ia. Tutkimuksessa oli käytössä 664:ään CF-potilaaseen perustuva biopankki, ja tietojen pohjalta pystyttiin valmistamaan elinmalleja, organoideja. Biopankista valittiin neljä otosta, joista kasvatettiin organoideja, ja joihin geenimuokkaus kohdistettiin. gRNA ja Cas9-proteiini olivat sisällytetty plasmidiin, joka siirrettiin organoidien sisälle elektroporaation avulla. Kaikissa neljässä organoidissa tapahtui geneettisiä korjauksia, eikä ei-haluttua sitoutumista havaittu (Geurts et al., 2020). Matkaa klinisiin kokeisiin yhä kuitenkin on, sillä vielä ei olla löydetty tapaa kuljettaa CRISPR-Cas9 -systeemiä haluttuihin elimiin.

3. Geenitekniikan riskit ja eettiset ongelmat ihmisen genomin muuntelussa

Geeniterapia on toimiva hoitokeino monien sairauksien hoidossa, ja sen käyttö tulee varmasti lisääntymään tulevaisuudessa tutkimusten edetessä. Kiitos CRISPR-Cas9-menetelmän, geenimuuntelu on tällä hetkellä helpompaa ja halvempaa kuin koskaan. Geenitekniikan käyttöön liittyy paljon positiivisia asioita, mutta siihen liittyy myös riskejä ja eettisiä ongelmia, varsinkin jos mennään ihmisen perinnöllisten ominaisuuksien muunteluun.

Vuoden 2018 marraskuussa uutisoitiin Kiinassa syntyneistä kaksosista, joiden CCR5-geeniä oli muokattu CRISPR-Cas9 -tekniikalla, jotta heistä tulisi HI-virukselle resistenttejä. Koe tuomittiin heti ympäri maailmaa, sillä sen toteuttamiseksi ei ollut tehty tarpeeksi tutkimusta, puhumattakaan kokeeseen liittyvistä riskeistä ja eettisistä näkökulmista (Cyranoski and Ledford, 2018). Myöhemmin kävi ilmi, että tutkimusta tehneet kolme kiinalaistutkijaa olivat väärentäneet papereita, jotta muokatut alkiot saatiin istutettua, ja että lapsia oli kaksosten lisäksi syntynyt vielä kolmas. Kaksosten genomeja tarkasteltiin ja todettiin, että CCR5-geenin muokkaus ei ollut toiminut suunnitellulla tavalla ja genomeista löytyi myös aivan uusia mutaatioita, joita ei ollut aiemmin tavattu ja joiden vaikutusta ei tiedetä. Kaikki kolme tutkijaa saivat toimistaan vankilatuomiot ja sakot (bbc.com, 2019). Vaikka tutkimus oli toteutettu epäammattimaisesti ja hämärissä olosuhteissa, se osoittaa, kuinka pitkälle geenimuuntelun saralla on päästy hyvin lyhyessä ajassa. Tapaus myös osoittaa, että lainsäädäntö ei enää pysy tieteen mukana.

Suomessa toimii Geenitekniikan lautakunta, joka toimii geenitekniikkalakiin (377/1995) liittyvissä asioissa. Tämän lain käsittelemiin organismeihin ihminen ei kuitenkaan kuulu. Useimmissa maissa ihmisen perinnöllisten geenien ja alkioden muokkaamiseen kuuluvien lakien puuttuminen tarkoittaa niiden olevan kiellettyä, mutta joissakin maissa, kuten Kiinassa ja Yhdysvalloissa lakien puuttuminen on tulkittu toisin. Joissakin maissa on kuitenkin jo tehty

päätöksiä esimerkiksi ihmisalkion geenien muokkaamisesta: vuonna 2015 Iso-Britannia hyväksyi mitokondrioiden korvaamisen koeputkihedelmöityksellä saadussa alkiossa, jos alkuperäisten mitokondrioiden perimässä on sairauksia aiheuttavia geenejä (Castro, 2016). Muualla maailmassa tämä ei ole – ainakaan vielä – sallittua, mutta tällaisen lain hyväksyminen missä tahansa maassa on harppaus kohti kokonaisvaltaista ihmisalkion geenien muokkausta. On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että ns. designvauvat, joiden genomi on muokattu vanhempien mieleiseksi, tulisivat olemaan laillisia vielä pitkään aikaan, sillä alkion geenien muokkaamiseen liittyy yksi suuri eettinen ongelma: itsemääräämisoikeus. On eri asia tarjota geeniterapiaa aikuiselle ihmiselle, jolta on mahdollista saada suostumus ja joka ymmärtää geneettisen muuntelun mahdolliset riskit, kuin muokata syntymättömän lapsen geenejä. Kiinassa syntyneiden kaksosten tapaus myös osoittaa, että ihmisalkion genomien muokkaus ei ole tällä hetkellä täysin turvallista.

Ihmisen perinnöllisiä tauteja ja geneettisiä häiriöitä on tuhansia. Tieteellisestä näkökulmasta olisi aivan suurenmoista, jos edes osa näistä voitaisiin parantaa geenimuuntelun avulla. Toisaalta, jos kaikki mahdollisesti sairauksia aiheuttavat geenit ja mutaatiot muokattaisiin pois perimästä, ihmisten genomeista tulisi hyvin samanlaisia eikä vaihtelua olisi. Entäpä geneettiset häiriöt, jotka eivät välttämättä aiheuta hengenvaaraa, mutta joiden ajatellaan olevan epänormaaleja? Hävitettäisiinkö nämä ominaisuudet ihmisen genomista kokonaan ja olisiko se eettisestä näkökulmasta oikein?

Jotta ihmisen ja ihmisalkion geenien muokkauksesta voi tulla turvallisempaa, tarvitaan vielä paljon tutkimusta. Varsinkin alkioden kohdalla tutkimusten toteuttaminen on vaikeaa, sillä käsitys siitä, milloin ihmisen elämä alkaa on erilainen riippuen maasta, kulttuurista ja yksilöstä. Juurikin näiden uskomuksellisten erojen takia maailmanlaajuisia lakeja geenimuunteluun liittyen tuskin pystytään koskaan säätämään. Yhteiskunnallista keskustelua ja maakohtaisten lakien säätämistä kuitenkin tarvitaan, sillä geenitekniikka on tehnyt niin suuren harppauksen viimeisen kymmenen vuoden aikana, ja sen potentiaali monien tautien hoidossa on suuri.

4. Lähteet

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709-1712.

bbc.com (2019) *China Jails 'Gene-Edited Babies' Scientist for Three Years*. Available at: <https://www.bbc.com/news/world-asia-china-50944461>. Viitattu 16.7.2020

Bibikova M, Golic M, Golic KG and Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161(3): 1169-1175.

Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, et al. (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology* 21(1): 289-297.

Cannan WJ and Pederson DS (2016) Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of Cellular Physiology* 231(1): 3-14.

Castro RJ (2016) Mitochondrial replacement therapy: the UK and US regulatory landscapes. *Journal of Law and the Biosciences* 3(3): 726-735.

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW and Helling RB (1973) Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 70(11): 3240-3244.

Corless V (2019) *The First CRISPR Gene Therapy to Cure Sickle-Cell Disease*. Available at: <https://www.advancedsciencenews.com/the-first-crispr-gene-therapy-to-cure-sickle-cell-disease/>. Viitattu 11.7.2020

Cyranoski D and Ledford H (2018) Genome-edited baby claim provokes international outcry. *Nature* 563(7733): 607-608.

Ebina H, Misawa N, Kanemura Y and Koyanagi Y (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports* 3(1): 2510.

Geurts MH, de Poel E, Amatngalim GD, Oka R, Meijers FM, Kruisselbrink E, et al. (2020) CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank. *Cell Stem Cell* 26(4): 503-510.e7.

Happonen P, Holopainen M, Sariola H, Sotkas P, Tenhunen A, Tihtarinen-Ulmanen M, et al. (2016) *Bios 5. Bioteknologia*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Huertas P and Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry* 284(14): 9558-9565.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M and Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169(12): 5429-5433.

Jansen R, Embden, Jan. D. A. van, Gaastra W and Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6): 1565-1575.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* 337(6096): 816-821.

Kansikas M, Nyström M and Peltomäki P (2017) DNA:n korjausmekanismien häiriöt ja niiden lääketieteellinen merkitys. *Duodecim* 133(3): 259-265.

Kim Y, Cha J and Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3): 1156-1160.

Ledford H (2020) CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. *Nature* 579(7798): 185.

Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, et al. (2011) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 39(14): 6315-6325.

Lino CA, Harper JC, Carney JP and Timlin JA (2018) Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery* 25(1): 1234-1257.

Liu J, Zhou G, Zhang L and Zhao Q (2019) Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing. *Frontiers in Immunology* 10: 456.

Lv J, Wu S, Wei R, Li Y, Jin J, Mu Y, et al. (2019) The length of guide RNA and target DNA heteroduplex effects on CRISPR/Cas9 mediated genome editing efficiency in porcine cells. *Journal of Veterinary Science* 20(3): e23.

Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. (2019) Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine* 25(2): 229-233.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ and Oost VD, John (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 13(11): 722-736.

Makarova KS and Koonin EV (2015) Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1311: 47-75.

Maule G, Arosio D and Cereseto A (2020) Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing. *International Journal of Molecular Sciences* 21(11): 3903.

Miller J, McLachlan AD and Klug A (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* 4(6): 1609-1614.

Nature Methods (2011) Method of the Year 2011. *Nature Methods* 9(1).

- Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP and Zakian SM (2014) TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 6(3): 19-40.
- Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, Goodwin MJ, Cradick TJ, McCaffrey AP, et al. (2012) Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Research* 40(12): 5560-5568.
- Ran F, Hsu P, Lin C, Gootenberg J, Konermann S, Trevino A, et al. (2013) Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 155(2): 479-480.
- Rebar EJ, Holmes MC, Urnov FD, Zhang HS and Gregory PD (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* 11(9): 636-646.
- Rogers JM, Barrera LA, Reyon D, Sander JD, Kellis M, Joung JK, et al. (2015) Context influences on TALE–DNA binding revealed by quantitative profiling. *Nature Communications* 6(1): 7440.
- Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. (2020) CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 367(6481): eaba7365.
- Stein R (2019) *Gene-Edited 'Supercells' make Progress in Fight Against Sickle Cell Disease*. Available at: <https://www.npr.org/sections/health-shots/2019/11/19/780510277/gene-edited-supercells-make-progress-in-fight-against-sickle-cell-disease?t=1593191729175>. Viitattu 11.7.2020
- Sundt P, Gladwin MT and Novelli EM (2019) Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology* 14(1): 263-292.
- synthego.com (2020a) *The Essential Guide to Genome Engineering: Techniques & Applications*. Available at: <https://www.synthego.com/learn/genome-editing-engineering>. Viitattu 19.3.2020
- synthego.com (2020b) *History of Genetic Engineering and the Rise of Genome Editing Tools*. Available at: <https://www.synthego.com/learn/genome-engineering-history>. Viitattu 27.3.2020
- Wagner TE, Hoppe PC, Jollick JD, Scholl DR, Hodinka RL and Gault JB (1981) Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 78(10): 6376-6380.
- Xiao Q, Guo D and Chen S (2019) Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9: 69.
- Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. (2014) Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(26): 9591-9596.

Zhao Z, Shi L, Zhang W, Han J, Zhang S, Fu Z, et al. (2018) CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget* 9(4): 5208-5215.